

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση φυτοφαρμακευτικών ουσιών στην εκδήλωση της
καταπόνησης»**

**Γεωργιάδης Νικόλαος
Κολαΐτη Ιωάννα Αγγελική
Σηφάκης Παναγιώτης**

ΒΟΛΟΣ 2017

«Επίδραση φυτοφαρμακευτικών ουσιών στην εκδήλωση της καταπόνησης»

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιεργειών,
Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών
Επιστημών, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, , **Επιβλέπουσα**
- 2. Γκολομάζου Ελένη**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα
Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών
Επιστημών, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας **Μέλος**

Στις οικογένειές μας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα προπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά τη χρονική περίοδο 2016-2017.

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την κα Π. Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια για την αμέριστη βοήθεια, τη συμπαράσταση, την καθοδήγηση και τις ευκαιρίες που απλόχερα μας πρόσφερε ως συνεπιβλέπουσα της πτυχιακής μας διατριβής, αλλά και κατά τη διάρκεια των σπουδών μας.

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε επίσης την Επίκουρο Καθηγήτρια κα Ε. Γκολομάζου για τη βοήθειά της, το ενδιαφέρον, τις πολύτιμες συμβουλές, την ευελιξία και την καθοδήγηση που μας πρόσφερε όλο αυτό το διάστημα.

Επίσης θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όλους τους φίλους μας που όλα αυτά τα χρόνια μας δίνανε κουράγιο και μας υπενθυμίζανε συνεχώς τους στόχους μας και τη σημασία επίτευξης αυτών βοηθώντας μας έτσι να τους επιτύχουμε. Τους ευχαριστούμε επίσης για τη συνεχή τους βοήθεια σε πάσης φύσεως προβλήματα και για την όμορφη παρέα τους όλα αυτά τα χρόνια στο Βόλο.

Δε θα πρέπει βέβαια να παραβλέψουμε το έτος μας, τους συμφοιτητές μας που με τον αγνό εκείνο συναγωνισμό και το υψηλό γνωστικό επίπεδο, μας βοήθησαν να ανέβουμε ακόμα ένα σκαλί προς το στόχο μας που δεν είναι άλλος από το να γίνουμε σωστοί επιστήμονες με σωστές γνώσεις και εφόδια τα οποία θα μας αναδείξουν στο μέλλον.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα εμπορεύσιμα είδη σε Εθνικό όπως και σε Ευρωπαϊκό επίπεδο. Για αυτό το λόγο υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για περαιτέρω έρευνα και μελέτη αυτών των ειδών όπως και στη διερεύνηση των επιπέδων καταπόνησης, αφού το στρες επηρεάζει άμεσα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της σάρκας των ιχθύων.

Η καταπόνηση ουσιαστικά είναι ο τρόπος με τον οποίο αντιλαμβάνεται ο κάθε οργανισμός οποιοδήποτε στρεσογόνο παράγοντα. Κάθε οργανισμός αντιδράει διαφορετικά στους παράγοντες καταπόνησης, όπως το κούνημα με την απόχλη στη συγκεκριμένη περίπτωση. Έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη διαφόρων ουσιών οι οποίες έχουν γενοπροστατευτική δράση όπως είναι για παράδειγμα τα συστατικά κάποιων αιθέριων ελαίων.

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά υγρά που περιέχουν τις ουσίες που είναι υπεύθυνες για τα αρώματα των φυτών. Διάφορα αιθέρια έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναισθητικά, ως ανοσοενισχυτικά όπως επίσης και σε θεραπείες βακτηρίων μυκήτων και παρασίτων. Τέτοιου είδους αιθέρια έλαια αποτελούν τα έλαια που προέρχονται από επεξεργασία κανέλας (*Cinnamomum zeylanicum*) και ρίγανης (*Origanum vulgare*), ουσίες που παρουσιάζουν κυρίως φαρμακευτικές ιδιότητες και όχι αναισθητικές και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία λόγω αυτών των ιδιοτήτων τους.

Για τους παραπάνω λόγους η χρήση μοριακών τεχνικών όπως είναι η comet assay με την οποία ασχοληθήκαμε στο συγκεκριμένο πείραμα, είναι αναγκαία αφού η μέτρηση της καταπόνησης μπορεί να μετρηθεί είτε μοριακά είτε με τη μέτρηση

κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος. Η συγκεκριμένη μοριακή τεχνική τυγχάνει ευρείας αποδοχής στην ανίχνευση της καταστροφής και επιδιόρθωσης του DNA σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Ο περιορισμός της Comet assay είναι ότι ανιχνεύει την καταστροφή του DNA σε μορφή θραυσμένων κυττάρων.

Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικές μεταχειρίσεις, μια με τη βασική τροφή, δυο με βασική τροφή εμπλουτισμένη με κανελέλαιο συγκέντρωσης 1% και 2% αντίστοιχα και δύο με 1% και 2% ριγανέλαιο αντίστοιχα. Έγινε απομόνωση ηπατοκυττάρων από τις τσιπούρες των πέντε διαφορετικών μεταχειρίσεων αφού πρώτα είχαν υποστεί έντονο στρες με ταρακούνημα χρησιμοποιώντας απόχη, για το χρονικό διάστημα των πέντε λεπτών. Αφού ακολούθησε η διαδικασία της Comet assay τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν στατιστικώς σημαντική καταπόνηση στο μάρτυρα μετά τη μεταχείριση όπως επίσης και σημαντική γενοπροστατευτική δράση της κανέλας 1%.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Τρόποι πρόκλησης καταπόνησης (stress).....	9
1.2 Αντίδραση οργανισμών στην καταπόνηση.....	11
1.3 Οξεία και χρόνια καταπόνηση.....	11
1.4 Τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	12
1.5 Κυριότερες φαρμακευτικές ουσίες, φυτικής προέλευσης	14
1.6 Αιθέρια έλαια	15
1.7 Αιθέρια έλαια και υδατοκαλλιέργειες.....	15
1.8 Τεχνική της ‘Comet Assay’.....	17
1.9 Σκοπός και στόχοι της παρούσας μελέτης.....	19
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	21
2.2 Απομόνωση ηπατοκυττάρων	22

2.3	Επίστρωση αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα.....	24
2.4	Ηλεκτοφόρηση και μέτρηση κομητών	26
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	33
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34
7.	ABSTRACT	39

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τρόποι πρόκλησης καταπόνησης (stress)

Ως καταπόνηση (stress) μπορεί να χαρακτηριστεί οποιοσδήποτε παράγοντας, είτε αυτός είναι εξωτερικός είτε εσωτερικός, ο οποίος μπορεί να διαταράξει την ομοιόσταση ή την κατάσταση προσαρμογής ενός οργανισμού. Οι παράγοντες καταπόνησης που μπορούν να διαταράξουν την ισορροπία, μπορεί να είναι φυσικοί, χημικοί, βιολογικοί, ανθρωπογενείς, φυσιολογικοί ή ακόμα και ψυχολογικοί.

Όλοι αυτοί οι παράγοντες όπως για παράδειγμα τα μολυσμένα ύδατα, η αύξηση ή μείωση θερμοκρασίας του νερού, ο θόρυβος και άλλοι, δεν αποτελούν στρες για τους ιχθύες αλλά παράγοντες στρες (stress factors), διότι όλοι οι οργανισμοί μέσα στη θάλασσα βιώνουν τις αλλαγές αλλά δε στρεσάρονται όλοι με τον ίδιο τρόπο. Επομένως ο κάθε οργανισμός επιλέγει πόσο και αν επιθυμεί να τον επηρεάσει ένας στρεσογόνος παράγοντας.

Οι ιχθύες είτε είναι εκτρεφόμενοι είτε ελεύθεροι στρεσάρονται καθημερινά από τα μολυσμένα θαλάσσια ή εσωτερικά ύδατα τα οποία έχει προκαλέσει ως επί των πλείστον η ανθρώπινη δραστηριότητα (Iwama, George K., 1998). Κάθε είδος εκτρεφόμενου οργανισμού έχει διαφορετικές φυσικές-χημικές απαιτήσεις τις οποίες θα πρέπει να έχει το υδάτινο περιβάλλον προκειμένου να μην στρεσσαριστεί ο οργανισμός. Αυτό σημαίνει ότι οποιαδήποτε αλλαγή στη θερμοκρασία, αλατότητα, **pH** και άλλων παραμέτρων, η οποία υπερβαίνει ή είναι πιο χαμηλή των απαιτήσεων του οργανισμού, μπορεί να φέρει σε κίνδυνο την υγεία και την επιβίωση του. Σε αντίθεση με τους εκτροφείς των χερσαίων ζώων, εκείνοι που εκτρέφουν θαλάσσιους οργανισμούς

αναγνωρίζουν ότι ο έλεγχος του στρες των οργανισμών είναι απολύτως απαραίτητος για την οικονομική τους επιτυχία. Αυτό συμβαίνει διότι στο θαλάσσιο περιβάλλον τα προβλήματα λόγω του στρες εμφανίζονται πιο συχνά. (Conte, 2004).

Η μέθοδος που θα επιλεγεί για τη θανάτωση των εκτρεφόμενων ιχθύων όπως και οι πρακτικές που εφαρμόζονται πριν από αυτή, επηρεάζουν την ποιότητα της σάρκας των ιχθύων. Όταν υπάρχουν πρακτικές πριν τη θανάτωση αλλά και μέθοδοι θανάτωσης που στρεσάρουν τους ιχθύες τότε εξαντλείται η ενέργεια των μυών, παράγεται γαλακτικό οξύ, μειώνεται το pH των μυών και το φαινόμενο της νεκρικής ακαμψίας εμφανίζεται πιο γρήγορα. Κατά αυτόν τον τρόπο υπάρχουν σημαντικά αρνητικά αποτελέσματα στην ποιότητα της σάρκας, και στη διατήρηση της ποιότητας των ψαριών. Με τη χρήση μη στρεσογόνων πρακτικών, το φαινόμενο της νεκρικής ακαμψίας θα λάβει χώρα στους ιχθύες πολύ πιο μετά, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να επεξεργαστούν και να συσκευαστούν προτού μπουκ στη νεκρική ακαμψία. Έτσι αυξάνεται η απόδοση της φιλετοποίησης, εάν υπάρχει, και μειώνονται οι ζημιές της σάρκας (Tibaldi et al., 2015). Ειδικότερα σε εκτρεφόμενους ιχθύες οι οποίοι υπόκεινται σε καταπόνηση παρατηρούνται επίσης επιβράδυνση αύξησης/ανάπτυξης του σώματος, διαταραχές στην αναπαραγωγή, αυξημένη ευαισθησία σε νοσογόνους παράγοντες και χαμηλή παραγωγικότητα.

Όπως καταλαβαίνουμε η μείωση του στρες και των βλαβερών συνεπειών του σε μια μονάδα είναι μείζονος σημασίας. Αυτό το σκοπό έχει και η παρούσα μελέτη, να υποδείξει ουσίες οι οποίες θα μπορέσουν να μειώσουν το στρες.

1.2 Αντίδραση οργανισμών στην καταπόνηση

Οι ιχθύες ανταποκρίνονται σχεδόν όπως όλα τα ανώτερα σπονδυλωτά. Ανεξάρτητα από την προέλευση της καταπόνησης η ανταπόκριση χαρακτηρίζεται από μεταβολές στο αίμα και στους ιστούς. Προσπαθώντας να αντιδράσει στον παράγοντα καταπόνησης και να επαναφέρει την ισορροπία, ο εκτρεφόμενος ιχθύς χρησιμοποιεί τα ενεργειακά του αποθέματα. Έτσι ο εκτρεφόμενος οργανισμός μπορεί να φαίνεται εξωτερικά ότι είναι φυσιολογικός και δεν επηρεάστηκε από το οτιδήποτε αλλά τα αποθέματα ενέργειάς του να εξαντλούνται (Lines & Frost, 1999).

Στην περίπτωση που ο στρεσογόνος παράγοντας δεν εξαφανιστεί, πολύ σύντομα θα επέλθει η εξάντληση του οργανισμού και τότε θα είναι εκτεθειμένος σε νοσογόνους παράγοντες. Αν δεν καταφέρει να προσαρμοστεί τότε πολύ πιθανό να επέλθει ο θάνατος. Το στάδιο της προσαρμογής ποικίλει ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια του παράγοντα καταπόνησης, το είδος του ιχθύος και τη γενοτυπική αντοχή σε παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση.

1.3 Οξεία και χρόνια καταπόνηση

Η οξεία μορφή καταπόνησης μπορεί να διαρκέσει από μερικά δευτερόλεπτα έως και κάτι ώρες και ουσιαστικά είναι μια φυσιολογική αντίδραση του οργανισμού η οποία παύει να υφίσταται μόλις σταματήσει η επίδραση του στρεσογόνου παράγοντα. Από την άλλη σε περίπτωση που διαρκέσει περισσότερο και κρατήσει μέρες, μήνες και περισσότερο, τότε γίνεται χρόνια με καταστρεπτικές συνέπειες τόσο στο μεταβολισμό

όσο και κυκλοφορικό, το ανοσοποιητικό και το πεπτικό σύστημα (Weerd & Komen, 1998).

Ο εξαναγκασμός των ιχθύων να αντιμετωπίσουν τις συνέπειες της καταπόνησης, συνεπάγεται συνεχή ενεργοποίηση ενεργειοβόρων βιοχημικών μηχανισμών και τελικά ζημιώνει τον ίδιο τον παραγωγό, για να μην αναφερθεί η ευημερία (welfare) των εκτρεφόμενων ιχθύων η οποία όσο περνάει ο καιρός οι καταναλωτές την απαιτούν.

1.4 Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα και το λαβράκι αποτελούν τον κύριο όγκο της παραγωγής της θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο. Ως άμεση συνέπεια, το μεγαλύτερο μέρος της απόδοσης της Μεσογειακής ιχθυοτροφίας απαρτίζεται από τα παραπάνω είδη. Η σημαντική αύξηση παραγωγής τους κατέστη δυνατή, χάρη στην προοδευτική βελτίωση των τεχνολογιών σχετικά με τη παραγωγή του γόνου στα ιχθυοτροφεία. Ως αποτέλεσμα αυτής της τεχνολογικής προόδου, αυξήθηκαν σημαντικά τα ιχθυοτροφεία στη μεσογειακή λεκάνη που ασχολούνται με την εκτροφή τους. Σήμερα η παραγωγή αυτών των δύο ειδών από εκτροφή, η οποία προέρχεται από γόνο παραγόμενο σε ιχθυοτροφείο, είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τη διαθέσιμη ποσότητα που προέρχεται από τη συλλεκτική αλιεία (Moretti et al. 1999)

Η συστηματική ταξινόμηση της τσιπούρας κατά τον Linnaeus (1758) είναι η εξής:

Βασίλειο: Animalia

Υποβασίλειο: Metazoa

Φύλο: Chordata

Υποφύλο: Vertabrata

Κλάση: Teleostei

Υποκλάση: Euteleostei

Οικογένεια: Sparidae

Το κυριότερο χαρακτηριστικό του είδους είναι μια λωρίδα χρώματος χρυσού και σχήματος V η οποία βρίσκεται στο μέτωπο λίγο πάνω από τα μάτια. Έχει σώμα ατρακτοειδές, πλευρικά πεπιεσμένο, κυρτή ράχη και κοντό ρύγχος και γενικά έχει ασημένιο-γκρι χρώμα. Αποτελεί είδος ευρύαλο και ευρύθερμο ενώ ζει μοναχικό και προτιμά τα υφάλμυρα νερά με τη γεωγραφικά του εξάπλωση να εκτείνεται από τον Ατλαντικό μέχρι τη Μεγάλη Βρετανία και τη Μεσόγειο θάλασσα (Νεωφύτου, 2001). Ανήκει στην κατηγορία των σαρκοφάγων ιχθύων. Αποτελεί είδος ερμαφρόδιτο εμφανίζοντας πρώτα το αρσενικό φύλο και στη συνέχεια το θηλυκό (πρωτανδρισμός). Όσο αφορά την αναπαραγωγή της πραγματοποιείται από τον Οκτώβριο μέχρι και τον Δεκέμβριο.

Η διατροφή των γεννητόρων σε ευνοϊκές συνθήκες έχει μεγάλη επίδραση στη ποιότητα των αυγών και στην αύξηση, 2-3% στην αλατότητα, κατά τη διάρκεια της επώασης, αναστέλλει την ανάπτυξη τους. Ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη τους είναι η θερμοκρασία. Η υπέρβαση των φυσιολογικών τιμών για το είδος κατά τη διάρκεια της επώασης, οδηγεί στη απώλεια της κυτταρικής συμμετρίας προκαλώντας μαζική θνησιμότητα και κατά συνέπεια πτώση του ρυθμού παραγωγής προνυμφών κατά τη διάρκεια της γαστρίδιωξης (Kamaci et al., 2005).

Η τσιπούρα θεωρείται ως ένα από τα πλέον δημοφιλή εδώδιμα είδη.. Θεωρείται τροφή πολυτελείας και είναι στόχος εντατικής αλιείας.(SF Mehanna ,2007).

1.5 Κυριότερες φαρμακευτικές ουσίες, φυτικής προέλευσης

Κατά την ελληνική αρχαιότητα μία σειρά βοτάνων και παρασκευασμάτων χρησιμοποιούνταν ως παυσίπονα, κατά των νευραλγιών, ως υπνωτικά και κατευναστικά (Μυρωνίδου-Τζουβελέκη και συν. 2009).

- Άνηθος (*Anethum graveolens*)
- Γλυκισίδα (*Pimpinella anisum*)
- Γλυκύρριζα (*Glycyrrhiza glabra*)
- Δίκταμο (*Origanum dictamnus*)
- Έρπυλλος (*Thymus serpyllum*)
- Κώνειον (*Conium maculatum*)
- Μανδραγόρας (*Mandragoras officinarum*)
- Μήκων (*Papaver somniferum*)
- Μηκωνίς (*Euphorbia exiqua ή vetusa*)
- Νάρδος (*Nardus stricta*)
- Νάρθηξ (*Ferula communis*)
- Πήγανον

1.6 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικές ουσίες που απομονώνονται μέσω μιας διεργασίας, όπως η απόσταξη, από ένα αρωματικό φυτό ενός συγκεκριμένου φυτικού είδους. Το αιθέριο έλαιο φέρει, συνήθως, το όνομα του φυτικού είδους από το οποίο έχει προκύψει. Είναι πτητικά υγρά που περιέχουν τις ουσίες που είναι υπεύθυνες για τα αρώματα των φυτών, που έχουν παραχθεί από τους ελαιογόνους αδένες κάθε φυτού.

Η χρήση τους χρονολογείται από την αρχαιότητα, καθώς και μεγάλη ποικιλία των θεραπευτικών και φαρμακευτικών τους χρήσεων εξασφάλισε τη διατήρηση της δημοτικότητας τους. Περίπου 700 διαφορετικά είδη φυτών περιέχουν χρήσιμα αιθέρια έλαια. Υπάρχουν τρεις παραλλαγές για τη διαδικασία απόσταξης, η υδροαπόσταξη, η απόσταξη με νερό και ατμό και η απόσταξη με ατμό. Κυριότερος τρόπος απόσταξης αιθέριων ελαίων είναι η απόσταξη με ατμό.

Γίνεται χρήση αυτών σε διάφορα προϊόντα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται από την βιομηχανία τροφίμων στην ζαχαροπλαστική, από την βιομηχανία καλλυντικών για την παραγωγή προϊόντων περιποίησης καθώς και από τις φαρμακοβιομηχανίες για τη συμβολή των λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται επίσης ως αναισθητικά στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών. Επιπλέον έχουν χρησιμοποιηθεί σε θεραπείες βακτηρίων, μυκήτων και παρασίτων, αλλά και στη συντήρηση διαφόρων προϊόντων (Christaki *et al.*2012).

1.7 Αιθέρια έλαια και υδατοκαλλιέργειες

Η χρήση των αναισθητικών στον τομέα της αλιείας και των υδατοκαλλιεργειών διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό στο χειρισμό κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης και της μεταφοράς των γεννητόρων, καθώς επίσης τα αναισθητικά χρησιμοποιούνται για να μειωθεί το επίπεδο του στρες που συνδέονται με τις εν λόγω διαδικασίες (Ross L.G. and Ross B. 2009, Iwama *et al.* 1998).

Η αποτελεσματικότητα του κάθε αιθέριου ελαίου έγκειται στο αν αφήνει κατάλοιπα στους ιστούς των ιχθύων, αν επηρεάζει τις αιματολογικές παραμέτρους καθώς και στον χρόνο αναμονής μετά την χρήση του. Ωστόσο η πολύωρη έκθεση των οργανισμών σε αναισθητικές ουσίες προκαλεί στρες και άγχος το οποίο συνεπάγεται αντίθετα αποτελέσματα από τα επιθυμητά. Προσφάτως, το αιθέριο έλαιο του φυτού *Aloysia triphylla* έχει καθιερωθεί ως αναισθητικό για την υδρόβια ζωή και έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Parodi *et al.* 2013).

Το πόσο καλό είναι ένα αναισθητικό φαίνεται αφ' ενός από τους χρόνους που διαγράφονται στα στάδια αναισθησίας και ανάνηψης και αφετέρου στο μέγεθος της βλάβης που υφίσταται το DNA του ψαριού. Είναι γνωστό ότι δεν υπάρχει άλλο μόριο, εκτός από το DNA, του οποίου η ακεραιότητα να είναι τόσο ζωτική για τη ζωή του κυττάρου. Κατά τη διάρκεια της ζωής κάθε οργανισμού, τα κύτταρα του εκτίθενται σε πληθώρα μέσων που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν βλάβες στο DNA τους και να προκαλούν μεταλλάξεις. Οι τροποποιήσεις αυτές του DNA πολλές φορές έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων ή την καταστροφή του DNA που οδηγεί το κύτταρο στην απόπτωση (προγραμματισμένος θάνατος) ή ακόμη και τον μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά.

1.8 Τεχνική της ‘Comet Assay’

Σύμφωνα με τον Fairbairn et al (1995) η ανάλυση του κομήτη εισήχθη για πρώτη φορά από τους Ostling και Johanson το 1984 ως μια τεχνική μικροηλεκτροφόρησης για την άμεση απεικόνιση της βλάβης του DNA σε απομονωμένα κύτταρα.

Όταν η ανάλυση μονοκυτταρικής πηκτής γίνεται σε συνθήκες με $pH > 7$, απομονωμένα κύτταρα τοποθετούνται σε λεπτή στρώση αгарόζης επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ακολουθεί κυτταρική λύση και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση σε $pH > 10$, αδρανοποίηση και χρώση με φθορίζουσα ουσία. Τα κύτταρα με αυξημένη βλάβη στο DNA επιδεικνύουν μια αυξημένη μετακίνηση του γενετικού υλικού στη διεύθυνση της ηλεκτροφόρησης. Η έκταση της βλάβης στο DNA ποσοτικοποιείται μετρώντας τη μετατόπιση του γενετικού υλικού ανάμεσα στον πυρήνα του κυττάρου και στην ουρά. Οι μετρήσεις γίνονται με ανάλυση της εικόνας μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή και κατάλληλου λογισμικού προγράμματος. Όταν πρωτοεμφανίστηκε η ανάλυση κομήτη, τα μήκη της ουράς χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης, όμως η εισαγωγή και η ανάλυση της εικόνας με ειδικό λογισμικό πρόγραμμα έδωσε την ικανότητα υπολογισμού και άλλων χαρακτηριστικών του κομήτη, παρέχοντας έτσι καλύτερες περιγραφές της συνολικής βλάβης στο DNA. Το Tail Moment (TM) θεωρείται ένας από τους καταλληλότερους δείκτες της προκαλούμενης βλάβης στο DNA, ανάμεσα σε άλλες παραμέτρους. Αυτή η παράμετρος συχνά αναφέρεται ως το γινόμενο του μήκους της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτού του δείκτη είναι ότι η ποσότητα του φθαρμένου DNA και η απόσταση μετατόπισης του γενετικού υλικού στην ουρά αντιπροσωπεύονται από ένα

μοναδικό αριθμό. Η ευαισθησία της τεχνικής των κομητών στην ανίχνευση της βλάβης στο γενετικό υλικό εξαρτάται από την ακρίβεια των μετρήσεων του DNA στις περιοχές της κεφαλής και της ουράς του κομήτη. Κάθε κύτταρο έχει την εμφάνιση κομήτη με λαμπρή φθορίζουσα κεφαλή και ουρά της οποίας το μήκος και η ένταση φθορισμού σχετίζεται με τον αριθμό των θραυσμάτων του κλώνου του DNA που προκαλούνται από διάφορους παράγοντες όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, η κακομεταχείριση, τα γενοτοξικά φάρμακα και άλλα.

Φυσικοί παράγοντες όπως η ηλιακή ακτινοβολία και οι ακτίνες X καταστρέφουν το DNA των κυττάρων τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων. Για την εκτίμηση της καταστροφής του γενετικού υλικού χρησιμοποιείται η τεχνική της comet ανάλυσης. Η αλλοίωση του DNA προκαλεί μια ακολουθία βιολογικών συνεπειών στον οργανισμό. Συγκεκριμένα στα υδρόβια ζώα έχει συσχετιστεί με την μειωμένη ανάπτυξη και την μειωμένη επιβίωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αλλοίωσης του γενετικού υλικού είναι οι θραύσεις του κλώνου που προκαλούνται από γενοτοξικές χημικές ενώσεις με άμεσο αποτέλεσμα την νέκρωση αυτού.

Η τεχνική της comet ανάλυσης εμφανίζει σωρεία πλεονεκτημάτων κατά τη χρήση της, όπως η μέτρηση καθώς και η ευαισθησία σε ότι αφορά την ανίχνευση βλάβης του DNA, αλλά και ο μικρός αριθμός κυττάρων που απαιτείται για την πραγματοποίηση της τεχνικής.

Οι λίμνες, οι ποταμοί και οι παραθαλάσσιες περιοχές είναι οι τελικοί υποδοχείς των αποβλήτων που προέρχονται από τη βιομηχανία και την γεωργία. Στα ύδατα αυτά υπάρχει μεγάλος αριθμός τοξικών ουσιών καθώς και νεοεμφανιζόμενοι ρυπαντές. Ο συνδυασμός των παραπάνω προκαλεί μεταλλάξεις για τον λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια η ζήτηση για καθαρά ύδατα έχει αυξηθεί άρδην. Κατά την δεκαετία του 1970

εφευρέθηκαν οι πρώτες μέθοδοι που στόχευαν στην ανίχνευση γενοτοξικών ουσιών στα υδάτινα περιβάλλοντα.

1.9 Σκοπός και στόχοι της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η εφαρμογή 5 ειδών τροφής σε ιχθύδια τσιπούρας για 3 μήνες και μέτρηση των επιπέδων του στρες με τη μέθοδο της comet assay μετά από υποβολή τους σε έντονο στρες λόγω χειρισμού πριν τη θανάτωση.

Ως περαιτέρω στόχος είναι η εύρεση ενός αιθέριου ελαίου το οποίο θα χρησιμοποιείται στις ιχθυοκαλλιέργειες ώστε να μειωθεί το στρες στους εκτρεφόμενους ιχθύες έχοντας έτσι θετικά αποτελέσματα στην τελική ποιότητα της σάρκας όπως επίσης και γρήγορη απόκτηση βάρους.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα από 12-2016 έως 04-2017. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν άτομα τσιπούρας βάρους 15gr και μήκους 8cm κατά μέσο όρο.

Οι ιχθύες μεταφέρθηκαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό με τη χρήση πλαστικής ισοθερμικής δεξαμενής με συνεχή παροχή οξυγόνου. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν περίπου 40 ιχθύες σε 5 διαφορετικά ορθογώνια ενυδρεία και για 3-4 μέρες δεν χορηγήθηκε τροφή έως ότου εγκλιματιστούν στο καινούργιο περιβάλλον.

Κάθε ενυδρείο περιείχε θαλασσινό νερό με σταθερή παροχή οξυγόνου, σταθερή ποσότητα αλατότητας περίπου 3,3% και εβδομαδιαία μέτρηση αμμωνιακών νιτρωδών και νιτρικών.



Εικόνα 1. Δύο ενυδρεία με ένα κοινό βιολογικό-μηχανικό φίλτρο από κάτω

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Τα ψάρια της παρούσας μελέτης χωρίστηκαν τυχαία σε πέντε(5) διαφορετικές μεταχειρίσεις.

Οι μεταχειρίσεις που προέκυψαν ήταν:

- i. των μαρτύρων M, η οποία ταΐζονταν καθημερινά με εμπορική ιχθυοτροφή
- ii. της ομάδας K1, η οποία ταΐζονταν καθημερινά με τροφή εμπλουτισμένη με 1% κανελέλαιο
- iii. τη της ομάδας K2, η οποία ταΐζονταν καθημερινά με τροφή εμπλουτισμένη με 2% κανελέλαιο
- iv. της ομάδας R1, η οποία ταΐζονταν καθημερινά με τροφή εμπλουτισμένη με 1% ριγανέλαιο
- v. της ομάδας R2, η οποία ταΐζονταν καθημερινά με τροφή εμπλουτισμένη με 2% ριγανέλαιο

Οι μετρήσεις της καταπόνησης (handling stress) πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 90 ημερών. Έγιναν δυο δειγματοληψίες, μια πριν την καταπόνηση και μια αφού οι ιχθύες υποβλήθηκαν σε έντονο στρεσογόνο παράγοντα από χειρισμό. Η καταπόνηση των ψαριών έγινε σε δίχτυ απόχης για πέντε λεπτά. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις μεταχειρίσεις δεκαπέντε (15) ψάρια, δηλαδή 3 για κάθε μεταχείριση. Μετά από κάθε υποβολή σε στρες, οι ιχθύες ζυγίζονταν και παίρνονταν μετρήσεις σταθερού και ολικού μήκους.



Εικόνα 2. Γενική άποψη του σταθμού.

2.2 Απομόνωση ηπατοκυττάρων

Η διαδικασία της μέτρησης ήταν η ακόλουθη. Αρχικά γινόταν η εξαλίευση των ιχθύων με τη χρήση απόχης, παίρνοντας ένα-ένα τα ψάρια, και στη συνέχεια υποβάλλονταν σε κυκλικές περιστροφές για πέντε λεπτά. Έπειτα τοποθετούνταν ο ιχθύς σε πλαστική λεκάνη με αναισθητικό (φαινοξυαιθανόλη), για τον καλύτερο χειρισμό κατά τη θανάτωση. Μετά το στάδιο της αναισθησίας μετρούνταν το σταθερό και το ολικό μήκος και το βάρος του με τη χρήση ιχθυόμετρου και ζυγαριάς αντίστοιχα. Στη συνέχεια το συκώτι αφαιρούνταν από τα ψάρια, αφού το ποσοστό της βλάβης θα υπολογίζονταν από ηπατικά κύτταρα.



Εικόνα 3. Μαγνητικός αναδευτήρας



Εικόνα 4. Vortex

Για την εξαγωγή του ήπατος πραγματοποιήθηκε τομή στη κοιλιακή περιοχή με χρήση αποστειρωμένης λαβίδας και αποστειρωμένου ψαλιδιού. Έπειτα το όργανο τοποθετούνταν σε πλαστικούς σωλήνες τύπου Falcon με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS. Με τη χρήση του Hank Balanced Salt Solution (HBSS) το ήπαρ καθαρίζεται από τυχόν υπολείμματα αίματος της τσιπούρας και ακολουθεί μια δεύτερη πλύση και ενέσεις κολλαγενάσης (0,04%) για να αφομοιωθεί ο ιστός του ήπατος. Το ήπαρ τεμαχίζεται και τοποθετείται μαζί με HBSS και κολλαγονάση σε tubes και ανακινούνται περιστροφικά για δεκαπέντε λεπτά. Μετά τα δεκαπέντε λεπτά το δείγμα φιλτράρεται με αποστειρωμένη γάζα και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 4000 στροφές για πέντε λεπτά. Όταν η φυγοκέντριση ολοκληρωθεί αφαιρείται το υπερκείμενο από τα tubes και προστίθεται HBSS στη πελέτα που μένει. Γίνονται ακόμα δύο τετοιες πλύσεις και στο τέλος η πελέτα που μένει διαλύεται εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.



Εικόνα 5. Φυγόκεντρος

2.3 Επίστρωση αгарόξης σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Για το στρώσιμο της αгарόξης πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, η πλάκα τοποθετείται στη κατάψυξη μέσα σε καθαρή αλκοόλη μέχρι να παγώσει για να διευκολυνθεί η πήξη της αгарόξης. Παρασκευάζουμε την Normal Melting Point αгарόξη, συγκέντρωσης 0,7% σε διάλυμα PBS. Μετά την ανάδευση του μείγματος τοποθετείτε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Η αντικειμενοφόρος πλάκα εμβαπτίζεται στην αгарόξη για μερικά δευτερόλεπτα και

αφού καθαρίζεται προσεκτικά η κάτω επιφάνεια της τοποθετείται σε πάγο για να ζελατινοποιηθεί.

Επιπλέον παρασκευάζεται ένα δεύτερο διάλυμα αγαρόζης (Low Melting Point) με συγκέντρωση 0,07% σε διάλυμα PBS. Το διάλυμα αναδεύεται, ομογενοποιείται και ακολουθείται η ίδια διαδικασία στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να γίνει διάφανο. Σε 20μL δείγματος προστίθενται 80μL αγαρόζης LMP όταν φτάσει στη θερμοκρασία δωματίου και τοποθετείται στην αντικειμενοφόρο πλάκα και τοποθετείται καλυπτρίδα. Η αντικειμενοφόρος με το δείγμα αφήνεται να κρυώσει και μετά την πήξη και της δεύτερης αγαρόζης απομακρύνεται με προσοχή η καλυπτρίδα.



Εικόνα 6. Επίστρωση αγαρόζης

Μετά τη σταθεροποίηση της αγαρόζης οι πλάκες τοποθετούνται σε διάλυμα λύσης (EDTA 100mM, Tris 10mM, 1% Triton-X NaCl 2,5mM και 10% DMSO-dimethylsulfoxide) με pH απαραίτητα μεγαλύτερο του 10. Οι πλάκες παραμένουν στο

διάλυμα λύσης για τουλάχιστον τέσσερις ώρες με σκοπό τη λύση των ηπατικών κυττάρων την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και την απελευθέρωση του γενετικού υλικού. Μετά τις τέσσερις ώρες οι αντικειμενοφόρες πλάκες βγαίνουν από το διάλυμα λύσης και ξεπλένονται με αποσταγμένο νερό για την απομάκρυνση των αλάτων.

2.4 Ηλεκτροφόρηση και μέτρηση κομητών

Για να γίνει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης οι πλάκες τοποθετούνται για δεκαπέντε λεπτά στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ώστε να γίνει η αποδιάταξη του DNA. Η σύσταση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης που παρασκευάζεται είναι 0,075M NaOH και 1mM EDTA με pH υψηλότερο του 12 και οι συνθήκες που ήταν απαραίτητες για τη διεκπεραίωση της διαδικασίας ήταν τα 30V και 300mA. Μετά την ηλεκτροφόρηση οι πλάκες «ξεπλένονται» προσεκτικά κάθε μία ξεχωριστά με ουδέτερο διάλυμα Tris (συγκέντρωσης 0,4M και pH 7,5) για να απομακρυνθεί οποιοδήποτε κατάλοιπο του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.

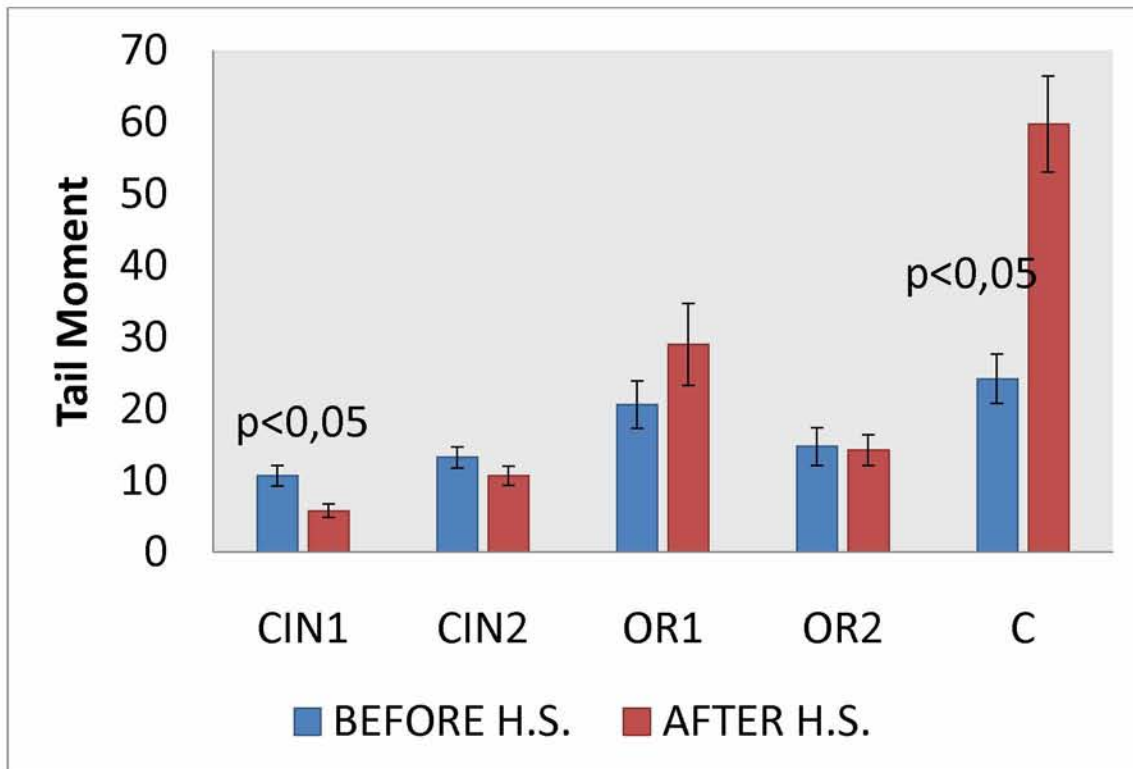


Εικόνα 7,8. Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης

Για τη χρώση χρησιμοποιείται το βρωμιούχο αιθίδιο, όπου σε κάθε πλάκα προστίθεται 20μL περίπου. Για την μελέτη ήταν απαραίτητο από κάθε δείγμα να ληφθούν φωτογραφίες από εκατό πυρήνες σε μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 40x με βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης και οι εικόνες καταγράφονταν μέσω του λογισμικού ProgRes Capture Pro 2.1. Για τον υπολογισμό της βλάβης του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Comet Assay Software Project (CASP) όπου μετρήθηκε το TM (Tail Moment) δηλαδή το ποσοστό του DNA που έχει απομακρυνθεί από τον πυρήνα επί το ποσοστό που βρίσκεται στη «ουρά». Όσο μεγαλύτερες είναι οι τιμές του TM τόσο μεγαλύτερη είναι η βλάβη που έχει υποστεί το κύτταρο.

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων τα αποτελέσματα των ηπατικών κυττάρων επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS statistic 17.0 και με το excel MS office.

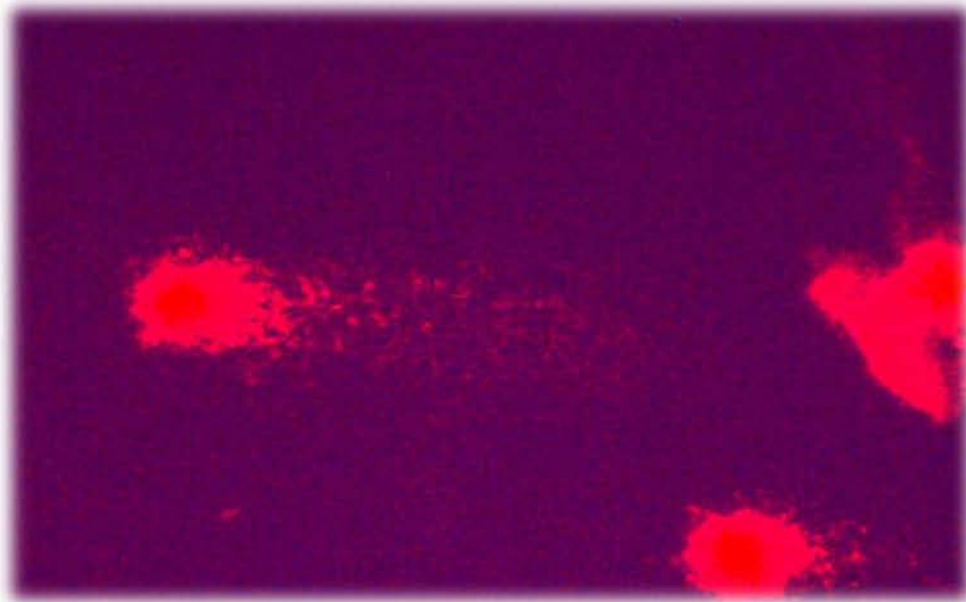
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Σχήμα 1. Μήκος της ουράς του κομήτη σε σχέση με τις 5 διαφορετικές τροφές πριν και μετά το έντονο στρεσάρισμα.

Η παράμετρος TM χρησιμοποιείται πιο συχνά στην τεχνική της Comet assay για την εκτίμηση της βλάβης του DNA, όπως φαίνεται και στο γράφημα όσο πιο μεγάλο είναι το μήκος της ουράς του κομήτη τόσο μεγαλύτερη είναι και η καταστροφή του DNA.

Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην καταπόνηση του μάρτυρα αφού υποβάλαμε τους εκτρεφόμενους ιχθύες σε έντονο στρεσογόνο παράγοντα κουνώντας τους με την απόχη, σε αντίθεση με το σαφώς μικρότερο στρες που είχαν υποστεί πριν από αυτή. Παρατηρήθηκε επίσης στη μεταχείριση με κανέλα 1% ότι το στρες μετά την καταπόνηση ήταν σημαντικά μικρότερο σε σχέση με τα επίπεδα του στρες πριν από αυτή. Τέλος παρατηρήθηκαν αμελητέες διαφορές ανάμεσα στην καταπόνηση πριν και μετά την μεταχείριση στις 4 διαφορετικές τροφές κανέλας και ρίγανης.



Εικόνα 9. Κομήτης όπως φαίνεται από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ακτινοβολίας UV

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πιθανοί παράγοντες καταπόνησης στις ιχθυοκαλλιέργειες εντατικής μορφής, είναι πολλοί. Στην παρούσα εργασία η παράμετρος που μελετήθηκε ήταν το στρες που προκλήθηκε από την κακομεταχείριση λόγω χειρισμού για πέντε λεπτά σε εκτρεφόμενους ιχθείς οι οποίοι ταΐζονταν με τρεις διαφορετικές τροφές, όπου και παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην καταπόνηση του μάρτυρα σε σχέση με εκείνη πριν το χειρισμό.

Οι μεταβολές του μεταβολισμού της γλυκόζης είναι μια κοινή ένδειξη άγχους της σύλληψης των ιχθύων (Rotllant et al., 2001). Κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας μελέτης στρες η οποία έγινε από τους Hosoya S. et al, τα ελεύθερα και ολικά επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος αυξήθηκαν σημαντικά, έως και δέκα φορές, στην ομάδα που είχε υποστεί στρες μετά τη δεύτερη εβδομάδα. Μετά το πέρας των τεσσάρων εβδομάδων χειρισμού όμως, τόσο η ελεύθερη όσο και η ολική κορτιζόλη μειώθηκαν στους ιχθύες που είχαν υποστεί στρες. Οι τιμές της κορτιζόλης μετά το χειρισμό δεν είχαν μεγάλη διαφορά από εκείνες πριν την καταπόνηση. Επίσης παρατήρησαν ότι το μέγεθος των μη στρεσαρισμένων ιχθύων έναντι εκείνων που είχαν υποστεί το χειρισμό ήταν αρκετά μεγαλύτερο.

Οι Mommsen T.P και Vijayan M.M (2007) παρατήρησαν ότι όταν στρεσάρουν ιχθύδια ιριδίζουσας πέστροφας η συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα έδειξε την αναμενόμενη παροδική ανύψωση η οποία ήταν σημαντική 1 ώρα μετά το χειρισμό και έπεσε στα επίπεδα όπου ήταν πριν στρεσαριστεί, στις 24 ώρες μετά τον χειρισμό του στρες. Επίσης παρατήρησαν ότι τα επίπεδα μεταγραφής αρκετών γονιδίων έδειξαν μεταβατικές αλλαγές στο ήπαρ της πέστροφας σε απόκριση στο χειρισμό του στρες.

Συγκεκριμένα, 40 μεταγραφές ήταν σημαντικά υψηλότερες σε 1 ώρα, ενώ μόνο 15 μεταγραφές ήταν σημαντικά υψηλότερες στις 24 ώρες μετά από έκθεση σε στρεσογόνο παράγοντα σε σύγκριση με την μη στρεσαρισμένη ομάδα 0 ωρών.

Οι Wiseman S. et al., (2007) μελέτησαν την οξεία καταπόνηση σε σαλμονοειδή με τη βοήθεια της μέτρησης κορτιζόλης στο αίμα. Οι ιχθύες υπέστησαν κακομεταχείριση τριών λεπτών και έπειτα από την πάροδο μιας ώρας πραγματοποιήθηκε αιμοληψία. Παρατήρησαν πως υπήρχε οξεία καταπόνηση η οποία έπαψε να υφίσταται με την παρέλευση ενός εικοσιτετραώρου.

Η κορτιζόλη παρουσίασε σημαντική αύξηση κατά την καταπόνηση τις πρώτες έξι ώρες, ενώ κατά τις έξι τελευταίες κατεγράφη σημαντική μείωσή της (Webb et al., (2007)). Στο σολομό *Oncorhynchus tshawytscha* η καταπόνηση λειτούργησε συσσωρευτικά έπειτα από συνεχείς και απότομες κακομεταχειρίσεις (Barton et al., 2003). Σε άλλα είδη, οι τιμές μπορεί να είναι υψηλότερες, όπως στην χρυσή πέρκα, *Macquaria ambigua* (240 ng / ml) που μετράται μετά από 30 λεπτά κουνήματος με την απόχη (Carragher and Rees, 1994).

Οι Waring et al παρατήρησαν ότι μετά από υποβολή του το *Scophthalmus maximus* σε καταπόνηση λόγω χειρισμού προκλήθηκε 10-πλάσια αύξηση της κορτιζόλης πλάσματος έως 70 ng / ml.

Οι Barcellos L. et al μετα απο μια ώρα αφότου τα ψάρια υποβλήθηκαν σε καταπόνηση λόγω χειρισμού, παρατήρησα ότι η συγκέντρωση κορτιζόλης αυξήθηκε στα ψάρια που είχαν υποστεί το χειρισμό των ειδών *Rhamdia quelen* και *Oreochromis niloticus* και οι συγκεντρώσεις παρέμειναν υψηλές για τουλάχιστον μια ώρα.

Η σύλληψη των ιχθύων και η καταπόνηση σχετίζεται συνήθως με σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις τους πλάσματος και του γαλακτικού οξέος στους μύες (Barton and Iwama, 1991).

Οι McConkey et al. (1988) αναφέρουν ότι ενδοκυτταρικές ενώσεις όπως οι ελεύθερες ρίζες, το μονοξειδίο του αζώτου, τα υπεροξειδία και τα ιόντα ασβεστίου που ενεργοποιούν ένζυμα όπως οι ενδονουκλεάσες και οι τοποϊσομεράσες, ίσως συντελούν άμεσα ή έμμεσα στον κερματισμό του DNA σε ηπατοκύτταρα υπό οξειδωτικό stress.

Το στιγμιαίο και έντονο stress προκαλεί βλάβη στο DNA των ηπατοκυττάρων, η οποία αποτυπώνεται αυξομειούμενη, υπό τη συνεχή επίδραση του στρεσογόνου παράγοντα (Lee & Steinert, 2003).

Στο πείραμα μας φάνηκε ότι η μεταχείριση με κανέλα συγκέντρωσης 1% ότι το στρες μετά την κακομεταχείριση ήταν σημαντικά μικρότερο σε σχέση με τα επίπεδα του στρες πριν από αυτή.

Έχει αποδειχτεί πως τα αιθέρια έλαια κανέλας (*Cinnamomum zeylanicum*) και ριγανέλαιου (*Origanum vulgare*), ως αναισθητικά σε τσιπούρες, έχουν τις λιγότερες θνησιμότητες (Καραφέρης 2013) και δρουν και σαν αντιοξειδωτικά των λιπιδίων (Veeck, A.P.L. et al. 2013). Τα αναισθητικά περιορίζουν το stress και βοηθούν στην ευζωία των οργανισμών που μελετούνται (Ashley 2006).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα εργασία τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι ότι η έντονη καταπόνηση των ιχθύων προκαλεί καταστροφή του DNA. Αλλά η χρήση των αιθέριων ελαίων της κανέλας (*Cinnamomum zeylanicum*) και της ρίγανης (*Origanum vulgare*), λειτουργεί προστατευτικά ως προς τη καταπόνηση. Στη περίπτωση ειδικά της τροφής που εμποτίστηκε με κανέλα συγκέντρωσης 1% φάνηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική γενοπροστατευτική δράση. Συμπερασματικά προκύπτει ότι τα αιθέρια έλαια ενδέχεται να προστατεύουν τους οργανισμούς από το stress και να συμβάλλουν στην ευζωία. Η τεχνική της comet assay επιτρέπει την ανίχνευση του ποσοστού της βλάβης του DNA σε απομονωμένα κύτταρα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

- **Barton, B. A., and Iwama, G. K. (1991).** Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1, 3–26.
- **Barton, B., Schreck, C. and Barton, L. (1987).** Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions and stress responses in juvenile rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, (2): 173-185.
- **C.P Waring, R.M Stagg, M.G Poxton (1996)** Physiological responses to handling in the turbot *Journal of Fish Biology*, 48, pp. 161-173
- **Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2012).** Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2(3), 228-243.
- **Collins A.R., Dobson V.L., Dysinska M., Kennedy G., Stetinad R. (1997).** The comet assay : What can it really tell us? *Mutation Research*, 375:183-193
- **Conte, F. S. (2004).** Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3), 205-223.
- **Dusinska M. and Collins A.R. (2008).** The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23:191-205
- **Fairbairn DW., Olive PL., O'Neill KL. (1995).** The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339 (1995) 37-59
- **Hosoya S., Johnson S. C., Iwama G. K., Gamperl A. K. and Afonso L. O. (2007).** Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to long-term handling stress. *Comparative*

Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, 146 (1): 78-86.

- **Iwama, G. K. (1998).** Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851(1), 304-310.
- **J Rotllant, P.H.M Balm, J Pérez-Sánchez, S.E Wendelaar-Bonga, L Tort(2001)** Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress, General and Comparative Endocrinology, 121, pp. 333-342
- **J.F Carragher, C.M Rees (1994),** Primary and secondary stress responses in golden perch, *Macquaria ambigua*, Comparative Biochemistry and Physiology, 107A pp. 49-56
- **J.H Van Weerd and J Komen (1998).** The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. Volume 120, Issue 1, 1 May 1998, Pages 107-112
- **Kamacı, H. O., Saka, Ş., & Fırat, K. (2005).** The cleavage and embryonic phase of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) eggs. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 22, 205-209.
- **Lee, R.F. & Steinert, S., 2003.** Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43–64.
- **Lines J. A. and Frost A. R. (1999).** Review of opportunities for low stress and selective control of fish. *Aquaculture Engineering*, 20: 211-230.
- **McConkey, D.J., Hartzell, P., Nicotera, P., Wyllie, A.H. & Orrenius, S., (1988).** Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology Letters*, 42: 123-130.

- **Mehanna, S. F. (2007).** A preliminary assessment and management of gilthead bream *Sparus aurata* in the Port Said fishery, the Southeastern Mediterranean, Egypt. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7(2).
- **Miyamae Y., Iwasaki K, Kinae N, Tsuda S, Murakami M and Tanaka M. (1997).** Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay: relationship between DNA migration and alkaline conditions. *Mutat Res*: 393:107-13.
- **Mommsen T. P. and Vijayan M. M. (2007).** Gene expression patterns in the liver during recovery from an acute stressor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology, D: Genomics and Proteomics*.
- **Morley N., Rapp A., Dittmar H., Salter L., Gould D. and Greulich K. (2006).** UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells. *Mutagenesis*, 21 (2): 105-14.
- **Morreti A., Pedini M., Cotollin G., Guidastrì R. (1999).** Manual on Hatchery Production of seabass and gildhead seabream. Volume 1. Food aquaculture organisation of United Nations.
- **Parodi, T. V., Cunha, M. A., Becker, A. G., Zeppenfeld, C. C., Martins, D. I., Koakoski, G., ... & Baldisserotto, B. (2014).** Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish physiology and biochemistry*, 40(2), 323-334.
- **Pottinger T. G. and Pickering A. D. (2006).** The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *Journal of Fish Biology*, 41 (3): 435-447.

- **Ross, L. G., & Ross, B. (2009).** *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. John Wiley & Sons.
- **Tibaldi, E., Zittelli, G. C., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., ... & Poli, B. M. (2015).** Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp.(T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, 440, 60-68.
- **Tice R. (1995).** The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Philips DH, Venitt S. Environmental Mutagenesis. Bios Scientific Publ., 315-339.
- **Winter M. J., Day N., Hayes R. A., Taylor E. W., Butler PJ. and Chipman J. K. (2004).** DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutat Res.* 552(1-2):163-75.
- **Wiseman S., Oschaff H., Bassett E., Malhotra J., Bruno J., Van Aggelen G., Webb M., Allert J., Kappenman K., Marcos J., Feist G., Schreck C., Ribeiro D., Marques M. and Salvadori D. (2007).** Lack of Effect of Prior Treatment with Fluoride on Genotoxicity of Two Chemical Agents in vitro. *Caries Research.*, 41(3): 239-243.
- **Yasuhara, S., Zhu, Y., Matsui, T., Tipirneni, N., Yasuhara, Y. and Kaneki M. (2003)** Comparison of comet assay, electron microscopy and flow cytometry for detection of apoptosis. *J. Histochem Cytochem.* 51(7):873-85.

Ελληνική βιβλιογραφία

- **Νεοφύτου Χ. (2001).** Βιολογία Θαλάσσιων Οργανισμών. Πανεπιστημιακές παραδόσεις. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Κάβουρας Μ. (2009).** Ανίχνευση DNA βλάβης/επιδιόρθωσης με COMET ανάλυση σε εκτρεφόμενους και φυσικούς πληθυσμούς ιχθύων εκτρεφόμενους σε βαρέα μέταλλα. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Δελούση Β. (2014).** Γενοτοξικότητα αιθέριων ελαίων. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Κασιμάτης Δ. (2008).** Ανίχνευση DNA βλάβης/επιδιόρθωσης με comet Ανάλυση σε εκτρεφόμενους ιχθείς εκτεθειμένους σε στρες. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

7. ABSTRACT

Sparus aurata is one of the most marketable species at both National and European level. That is the reason why there is a big interest for further research and study of these kinds of species as well as researching the strain levels, since stress directly affects the organoleptic characteristics of fish.

Stress is essentially the way in which each organism perceives any stressor. Each organism reacts differently to various stress factors. The existence of various substances have been observed which have generic protective effect, such as the ingredients of some essential oils.

Essential oils are volatile liquids that contain the substances responsible for plant fragrances. Various essential oils have been used as anesthetics, adjuncts as well as in bacteria, fungi and parasite treatments. These kind of essential oils are cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and oregano (*Origanum vulgare*), they are mainly have pharmaceutical properties rather than anesthetic and were used in the present study because of these properties.

For the reasons above, the use of molecular techniques such as the comet assay we have dealt with in the present study is necessary since the measurement of strain can be measured either genomically or by measuring cortisol in plasma. This particular molecular technique is widely accepted in the detection of DNA destruction and repair in prokaryotic and eukaryotic cells. The limitation of the Comet assay is that it detects DNA destruction in the form of broken strands.

In this particular study 5 different approaches have been used, the first is with the basic diet, the other two with cinnamon oil of 1% and 2% concentration respectively and the last two with 1% and 2% oregano oil concentration respectively. Hepatocytes were isolated from the fishes of the five different approaches, after having them suffer severe stress by shaking the fishes with the use of fishnet for a five-minute period. After the Comet procedure that followed, the results that occurred showed statistically significant stress in the post-treatment control as well as significant genotoxic effects of 1% cinnamon.